


PHOSPHATASE OR SULFATASE COLORIMETRY AND COLORIMETER**Publication number:** JP59130284**Publication date:** 1984-07-26**Inventor:** HORUSUTO HARUNITSUSHIYU; OTSUTO ESU
BORUFUBAISU**Applicant:** BAYER AG**Classification:**

- international: C07D215/22; C07D311/16; C07D405/04; C07D413/04;
C07D413/06; C07D417/04; C07F9/09; C07F9/60;
C07F9/655; C07F9/6553; C07F9/6558; C12Q1/42;
G01N33/50; C07D215/00; C07D311/00; C07D405/00;
C07D413/00; C07D417/00; C07F9/00; C12Q1/42;
G01N33/50; (IPC1-7): C07D311/16; C07D405/04;
C07D413/04; C07D417/04; C07F9/09; C07F9/60;
C12Q1/42; G01N33/50; G01N33/52

- European: C07F9/60; C07F9/655P60; C07F9/6558B;
C07F9/6558C; C12Q1/42

Application number: JP19830242358 19831223**Priority number(s):** DE19823248043 19821224**Also published as:** DE3248043 (A1)**Report a data error here**

Abstract not available for JP59130284

Abstract of corresponding document: **DE3248043**

Novel fluorogenic phosphoric esters of 7-hydroxycoumarine derivatives, which are also cleaved by acidic phosphatases, forming a highly fluorescent, coloured anion, and can be used in an improved determination method for phosphatases.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—130284

⑮ Int. Cl.³
C 07 D 311/16
405/04
413/04
417/04
C 07 F 9/09
9/60
C 12 Q 1/42
G 01 N 33/50

識別記号

庁内整理番号
7169—4C
7431—4C
7431—4C
7431—4C
7311—4H
7311—4H
8213—4B
Z 8305—2G ※

⑯ 公開 昭和59年(1984)7月26日

発明の数 3
審査請求 未請求

(全 18 頁)

⑰ フォスファターゼまたはスルファターゼの比
色定量または蛍光定量用の新規発色原または
蛍光原エステル

ドイツ連邦共和国デー5203ムー
フ・ハイネンブツシュ 4

⑱ 出 願 人 バイエル・アクチエンゲゼルシ
ヤフト

⑲ 特 願 昭58—242358

ドイツ連邦共和国レーフェルク
ーゼン (番地なし)

⑳ 出 願 昭58(1983)12月23日

優先権主張 ㉑ 1982年12月24日 ㉒ 西ドイツ
(DE) ㉓ P3248043.1

㉔ 代 理 人 弁理士 小田島平吉

最終頁に続く

㉕ 発 明 者 ホルスト・ハルニツシュ

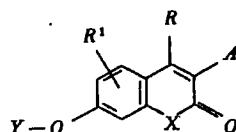
明 細 書

1 発明の名称

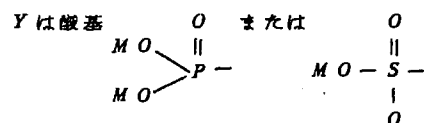
フォスファターゼまたはスルファターゼの
比色定量または蛍光定量用の新規発色原ま
たは蛍光原エステル

2 特許請求の範囲

1. 式



式中



を意味し、

M は水素もしくはアルカリ金属または水酸

基を含有することもある 1～4 個の C₁～
C₄ アルキル基で置換されていることもよいピ
リジニウムもしくはアンモニウムイオンを
表わし、

X は—O—または—N Q—を表わし、

Q は水素、1～2 個の OH 基によつて置換
されていることもある C₁～C₄ のアルキ
ル、または C₁～C₄ のアルコキシカルボ
ニルを表わし、

R は水素、塩素、臭素、シアノまたはカル
バモイルを表わし、

A はシアノ、C₁～C₄ アルコキシカルボ
ニルまたは 1～2 個の C₁～C₄ アルキル
基により置換されていることもあるカルバ
モイルもしくはスルファモイル、または C₁
～C₄ アルキルスルフォニル、ベンジルス
ルフォニル、フェニルスルフォニル、p-

トルイルスルフォニル、*p*-クロロフェニル
スルフォニル、スルフォ、ニトロ、フェ
ニル、*p*-トルイル、スルフォフェニル、
または $C_1 \sim C_4$ アルキル、塩素、 $C_1 \sim$
 C_4 アルコキシ、カルボキシル、 $C_1 \sim C_4$
アルコシカルボニル、シアノ、トリフル
オロメチル、 $C_1 \sim C_4$ アルキルスルフェ
ニル、シクロヘキシル、フェニルもしくは
スルフォによつて置換されていることもあ
るベンズオキサゾール-2-イル、ベンゾ
チアゾール-2-イル、チアゾール-2-
イル、ベンズイミダゾール-2-イル、キ
ナゾール-4-オン-2-イル、5-フェ
ニル-1, 8, 4-チアジアゾール-2-
イル、5-フェニル-1, 8, 4-オキサ
ジアゾール-2-イルもしくは2-もしくは
4-ピリジル基を被わし、

- 8 -

トキシまたはスルフォで置換されているこ
ともあるベンゾチアゾール-2-イルまた
はベンズオキサゾール-2-イル基を被わ
すことを特徴とする

特許請求の範囲第1項記載の化合物。

4. 担体と有効量の特許請求の範囲第1項記載
の化合物とからなることを特徴とする、試料中の
フォスファターゼ活性またはスルファターゼ活性
の比色定量または定量用の組成物。

5. 担体が活性化合物を溶解する液体であるこ
とを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の組成
物。

6. 担体が固体であることを特徴とする特許請
求の範囲第4項記載の組成物。

7. 試料をフォスファターゼ活性またはスル
ファターゼ活性の量に応じて検知可能な変化を受け
る化合物と接触させ、上記変化の程度を測定し、

- 5 -

R_1 は水素またはスルホン酸基を表わす。
の化合物。

2. A が1~2個の $C_1 \sim C_4$ アルキル基、1
~2個の塩素原子、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ、
 $C_1 \sim C_4$ アルキルスルフォニル、カルボ
キシル、 $C_1 \sim C_4$ アルコシカルボニル、
シクロヘキシル、フェニルまたは酸基で置
換されていることもあるベンズオキサゾー
ル、ベンゾチアゾール-2-イル、チアゾ
ール-5-イル、ベンズイミダゾール-2
-イル、キナゾール-4-オン-2-イル、
5-フェニル-1, 8, 4-チアゾール-
2-イルまたは4-ピリジル基を表わすこ
とを特徴とする

特許請求の範囲第1項記載の化合物。

3. R が CN を表わし、

A がメチル、エチル、塩素、メトキシ、エ

- 4 -

その結果から試料中のフォスファターゼ活性また
はスルファターゼ活性を定量することによる試料
中のフォスファターゼ活性またはスルファターゼ
活性の比色定量法または蛍光定量法において、上
記化合物として特許請求の範囲第1項記載の化合
物を使用することを特徴とする改良法。

8. 発明の詳細な説明

本発明はフォスファターゼまたはスルファター
ゼの影響下で強く蛍光発色するアニオンを形成し、
フォスファターゼおよびスルファターゼの改良さ
れた比色定量法または蛍光定量法に使用し得る新
規な発色原 (chromogenic) かつ蛍光原
(fluorogenic) のリン酸エステルおよび硫
酸エステルに関するものである。

フォスファターゼの比色定量法は比較的早くか
ら知られていた。臨床分析ではフォスファターゼ
により *p*-ニトロフェノールとリン酸塩とに分解

- 6 -

されるリン酸 *p*-ニトロフェニルが殆んど独占的に用いられている。上記フェノール誘導体の吸光度の増加を時間の関数として測定する。上記フェノール誘導体の生成はアルカリの添加によつても達成されるが、その際、上記酵素反応は中断される。したがつて、これは終点法になる〔Bergmeyer, *Methoden der enzymatischen Analyse* (酵素的分析法) 第1巻、888ページ、Verlag Chemie, Weinheim, 1974)。

フォスファターゼ活性の蛍光定量法もまた、比較的早くから知られていた (Guilbault, *Enzymatic Method of Analysis*, Pergamon Press 1970)。蛍光法は極めて高感度で、極端に低い酵素濃度でも本法により検出で、定量的もできる。蛍光法に用いられる公知のフォスファターゼ試薬はリン酸ウンベリフェ

- 7 -

光吸収剤がある場合には、光吸収または熱光と検査中の物質のそれとの間で、わずらわしい重なり合いが生ずる。基質の吸収帯と遊離された発色団または発光団の吸収帯との間にわずかなずれしかないような酵素基質の場合には2つの吸収帯の間にあまりにも著しい重なり合いが生じてこの方法の精度を減少させる。その上、現在でも、可視領域における光吸収または発光励起を用いてフォスファターゼによる酵素的分解反応を直接に動的監視し得る方法はまだ知られていない。

さらに、上述の先行技術の臨床分析に用い得るほど十分に迅速なリン酸エステル分解反応はアルカリ性 *pH* 領域でのみ生起する。しかし、診断のため、たとえば前立腺癌の早期確認のためには酸フォスファターゼ活性を定量することも重要なのである。

米特許第 3,772,840 号は、たとえば細菌

コン (G. G. Guilbault et al., *Anal. Letters* 1 (1968) 888)、リン酸 4-メチルウンベリフェロン (H. H. Fernley, P. G. Walker, *Biochem. J.* 97 (1965) 95)、フラセノールリン酸エステル (D. B. Land, E. Jakim, *Anal. Biochem.* 16 (1966) 481)、 α -ナフトールリン酸エステル (D. W. Moss, *Clin. chim. Acta* 5 (1960) 288)、 β -ナフトールリン酸エステル (L. J. Greenberg, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 9 (1962) 480) およびリン酸 8-0-メチルフルオレッゼイン (H. D. Hill et al., *Anal. Biochem.* 24 (1968) 9) などである。

これら公知検出法は各種の理由で十分に解決すべきものとは言えない。蛍光性酵素基質に種々の

- 8 -

を含有する尿中にあるようなフォスフォジエステラーゼの蛍光定量に用いることを企図したリン酸ビス-クマリニルフォスファターゼについて記述している。これらの化合物の欠点は水に殆んど溶解せず、実際の応用が制限されているということである。

スルファターゼの比色定量法もまた比較的古くから知られていた。たとえば、ロイ (Roy, *Biochem. Journal* 62 (1956) 41) はスルファターゼにより硫酸塩とニトロカテコールとに分解する硫酸ニトロカテコールを基質として用いている。ニトロカテコールの生成は比色的に追跡される。レオン等 (Leon et al., *Biochem. J.* 75 (1960) 612) は同じ意図で硫酸 *p*-ニトロフェニルを用いている。ダッジソンおよびスペンサー (Dodgson, *Spencer, Biochem. J.* 55 (1958)

- 10 -

815) は硫酸 *p*-アセチルフエニルを用いている。

スルファターゼ活性の蛍光定量法も同様に先行技術に属する (Guilbault, *Enzymatic Methods of Analysis*, Pergamon Press 1970)、蛍光法は高感度であつて、極端に低濃度の酵素でもこの方法を用いて検出し、定量することができる。蛍光法に用いられる公知のスルファターゼ試薬は各種蛍光原の硫酸エステルである。シャーマンおよびスタンフィールド (Sherman and Stanfield, *Biochem. J.* 102 (1967) 905) は終点法を利用したアリル-スルファターゼの定量に硫酸 4-メチルウンベリフエロンを用い、ガルボーおよびヒアセルマンは数多くの硫酸エステル (たとえばインドキシル、 β -ナフトール、4-メチルウンベリフエロン、フルオレシセインおよびレゾルフィ

ン等の硫酸エステツ) について、スルファターゼの直接動的 (Kinetic) 定量に対するその安定性を研究した (Guilbault and Hiersermann, *Anal. Chem.* 41 (1969), 2006)。

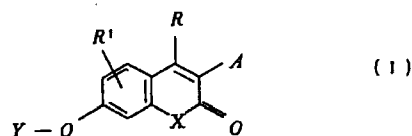
しかし、これらの公知のスルファターゼ検出法は同様に種々の理由から十分に満足すべきものではない。上記先行技術の硫酸エステル類は酵素濃度が比較的高いときにのみ十分迅速に分解し、したがつて、臨床分析には殆んど使用できないが、診断、たとえばある種の遺伝性疾患の早期確認のためには極めて小さい活性でも定量することが重要なのである。その上、このエステルの蛍光および加水分解中に生成したアニオンの蛍光と、多くの公知の蛍光原硫酸エステルの蛍光との間にわずらわしい重なり合いが生ずる。加えて、先行技術のある種の試薬は装置にかなりの出費を必要とす

- 11 -

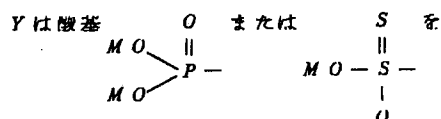
るのである。

本発明の目標はフォスファターゼまたはスルファターゼの比色的または発光的検出用に先行技術の上記欠点を持たない試薬を提供することにある。この目標は本発明のリン酸エステルおよび硫酸エステルにより達せられた。

本発明は一般式



式中



意味し、

M は水素もしくはアルカリ金属または水酸

- 18 -

基を含有することもある 1~4 個の $C_1 \sim C_4$ アルキル基で置換されていてもよいピリジニウムもしくはアンモニウムイオンを表わし、

X は -O- または -NQ を表わし、

Q は水素、1~2 個の OH 基によつて置換されていることもある $C_1 \sim C_4$ のアルキル、または $C_1 \sim C_4$ のアルコキシカルボニルを表わし、

R は水素、塩素、臭素、シアノまたはカルバモイルを表わし、

A はシアノ、 $C_1 \sim C_4$ のアルコキシカルボニル、または 1~2 個の $C_1 \sim C_4$ アルキル基により置換されていることもあるカルバモイルもしくはスルファモイル、または $C_1 \sim C_4$ のアルキルスルフォニル、ベンジルスルフォニル、フェニルスルフォニ

- 14 -

ル、*p*-トルイルスルフォニル、*p*-クロ
ロフェニルスルフォニル、スルフォ、ニト
ロ、フェニル、*p*-トルイル、スルフォ
フェニル、または1~2個の $C_1 \sim C_4$ アル
キル基、1~2個の塩素原子、 $C_1 \sim C_4$ ア
ルコキシ、カルボキシル、 $C_1 \sim C_4$ ア
ルコキシカルボニル、シアノ、トリフルオ
ロメチル、 $C_1 \sim C_4$ アルキルスルフォニ
ル、シクロヘキシル、フェニルもしくはス
ルフォによつて置換されていることもある
ベンズオキサゾール-2-イル、ベンゾチ
アゾール-2-イル、チアゾール-2-イ
ル、ベンズイミダゾール-2-イル、キナ
ゾール-4-オン-2-イル、5-フェニ
ル-1, 8, 4-チアジアゾール-2-イ
ル、5-フェニル-1, 2, 4-オキサジ
アゾール-2-イルもしくは2-もしくは

- 15 -

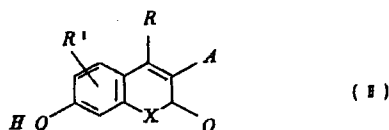
式(1)の特に好ましい化合物は式中

Aがメチル、エチル、塩素、メトキシ、エ
トキシまたはスルフォで置換されているこ
ともあるベンゾチアゾール-2-イルまた
はベンズオキサゾール-2-イル基を被わ
し、

RがCNを被わす

ようなものである。

本発明記載の式(1)のリン酸エステルは式



式中

X、A、Rおよび R^1 は上述の意味を有す
る、

のヒドロキシ化合物を、まず、5価のリンのハロ

- 17 -

4-ピリジル基を被わし、

R_1 は水素またはスルフォニル基を被わす。

の新規なエステル類に関するものである。

一般式(1)の好ましい化合物は式中

Aが1~2個の $C_1 \sim C_4$ アルキル基、1
~2個の塩素原子、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ、
 $C_1 \sim C_4$ アルキルスルフォニル、カルボ
キシル、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシカルボニル、
シクロヘキシル、フェニルまたはスルフォで
置換されていることもあるベンズオキサゾ
ール-2-イル、ベンゾチアゾール-2-
イル、チアゾール-5-イル、ベンズイミ
ダゾール-2-イル、キナゾール-4-オ
ン-2-イル、5-フェニル-1, 8, 4
-チアジアゾール-2-イルまたは4-ピ
リジル基を被わす

ようなものである。

- 16 -

ゲン化合物と(任意に無機または有機の酸捕捉剤の
存在下に)反応させ、ついで生成したジハロゲノ
フオスフォニルオキシ化合物を加水分解する方法
により調製することができる。

5価のリンのハロゲン化合物の例はオキシ三塩化
リン、オキシ三臭化リンおよび五塩化リンである
が、分子がスルフォ基を含有するならば後者を用
いるのが好ましい(一時的に対応するスルフォク
ロライドに転化する)。

適当な酸捕捉剤は無機または有機の塩基、たと
えば、無水炭酸カリウムまたは無水炭酸ナトリウ
ム、酸化マグネシウム、トリエチルアミン、コ
リジン、ピコリン混合物、ピリジンおよびジメチ
ルアニリン等である。

この反応は好ましくは溶剤または希釈剤の存在
下、-5乃至100℃の温度範囲で、オキシ三ハ
ロゲン化リンを用いる場合には好ましくは0~

- 18 -

80℃で PCl_5 を用いる場合には好ましくは20～90℃で行なわれる。

適当な溶剤または希釈剤は反応条件で不活性な有機溶媒たとえばトルエン、クロロベンゼン、ジクロロベンゼン、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ジクロロプロパン、トリクロロエチレン、アセトニトリル、ジオキサン、テトラヒドロフランまたは上記有機塩基の一種たとえばピリジンである。

5価のリンのハロゲン化合物と2分子の(Ⅱ)との反応を避けるため、適宜上述の溶媒の一種にあらかじめ溶解した(Ⅱ)を徐々に最終成分として添加して、反応の進行中ハロゲン化リンの過剰が保たれるようにするのが有利である。

中間体のジクロロフオスフォニルオキシ化合物を加水分解して(Ⅰ)を得る反応は、たとえば、水とともに注意深く約50℃に加温することによ

- 19 -

る。この反応は塩化スルフリル(SO_2Cl_2)を用いても対応する手法により行なうことができ、この場合には硫酸モノエステル塩化物が中間体として生成し、続く加水分解により遊離の sulfonic acid またはその塩の一種に転化する。

適当な塩捕促剤は上述の全ての無機および有機塩基である。

この反応は好ましくは溶剤または希釈剤の存在下、-5乃至100℃の温度範囲で、塩化スルフリルを用いる場合には好ましくは0～80℃で行なわれる。

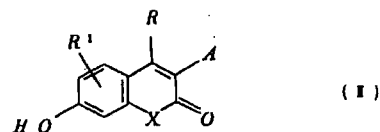
適当な溶剤または希釈剤は上に既に記述した、反応条件下で不活性な全ての有機液体、または上述の有機の一種、たとえばピリジンである。

硫酸二塩化物が2分子の(Ⅱ)と反応するのを避けるため、適宜上述の溶媒の一種にあらかじめ

- 21 -

り行なわれるが、0～25℃の温度の、よりおだやかな条件下ではアルカリ金属水酸化物溶液もしくはアルカリ金属炭酸塩溶液、ピリジンまたはアンモニア水で中和することによつても行なわれる。ついで、生成したアルカリ金属塩またはアンモニウム塩を真空中で乾燥するまで蒸発させるか、または、鉱酸、たとえば硫酸で酸性にして遊離酸($M=H$ であるⅠ)を分離し、過する。

本発明記載の式(Ⅰ)の硫酸エステルは、式(Ⅱ)



のヒドロキシ化合物を有機溶媒中で(好ましくは無機または有機の塩基捕促剤の存在下)クロロスルホン酸と反応させて、生成した硫酸モノエス

- 20 -

テルを塩の形で単離する方法で調製することができる。この反応は塩化スルフリル(SO_2Cl_2)を用いても対応する手法により行なうことができ、この場合には硫酸モノエステル塩化物が中間体として生成し、続く加水分解により遊離の sulfonic acid またはその塩の一種に転化する。

中間体の硫酸モノエステル塩化物を加水分解して(Ⅰ)を得る反応は同様にたとえば水とともに約50℃まで注意深く加温することにより行なわれるが、0～25℃の温度でのよりおだやかな条件下ではアルカリ金属水酸化物溶液もしくはアルカリ金属炭酸塩溶液、ピリジンまたはアンモニア水を用いる中和によつても行なわれる。ついで、生成したアルカリ金属塩またはアンモニウム塩は真空中で乾燥するまで蒸発させるかまたは、鉱酸、たとえば硫酸を用いて酸性にし、過することにより遊離の酸($M=H$ であるⅠ)にする。

上述の(Ⅱ)のO-スルフォニル化法は本質的にはフーベン-ワイル(Houben-Weyl)が Methoden der Organischen Chemie

- 22 -

(有機化学の方法) 第12巻/2 (1964)、
172~177ページ、または第9巻 (1955)
665ページに記載した芳香族ヒドロキシ化合物
のO-フォスフォル化またはO-スルフォニル
化の一般法と一致する。

式(1)の出発化合物は公知(米国特許明細書
第3,521,187号、化合物11; DE-OS
(西ドイツ公開明細書) 第2,702,887号;
DE-OS (西ドイツ公開明細書) 第3,044,1
28号; DE-OS (西ドイツ公開明細書) 第2
100,295号およびDE-OS (西ドイツ公開
明細書) 第3,229,801号)であるか、または
上記明細書に述べられた方法により調製すること
ができる。

式(1)の新規な化合物は水溶性で、淡青色の
($R=H$ 、 Cl または Br)、または緑色がかつ
た($R=CN$ または $CONH_2$) 発光を発し、多

- 28 -

先行技術のフォスファターゼ試薬と比較して、
式(1)の新規なリン酸エステルは相当な長所を
有している。

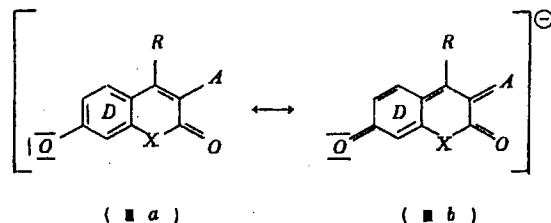
1. 酵素加水分解により生成するフェノール
イオン(Ⅱa-Ⅱb)の吸収帯が、ストークスシ
フトが大きいため、このリン酸エステルの吸収と
の関係では重なり合いが全くなく、したがってフ
エノールイオンの吸収の増加を比色的に容易に追
跡できる。

2. (1)の酵素分解により得られるフェノー
ルイオン(Ⅱa-Ⅱb)の強力な発光と使用する
試薬(1)の微弱な発光との間に煩わしい重なり
合いが全くなく(高ストークスシフト)、発光
度的に追跡できる。

3. 通常無視できない妨害となる生体物質の発
光バックグラウンドを伴う紫外光励起も、リン
酸8-O-メチルフルオレッセシンを使用する

- 25 -

くの場合わずかしき発色していない物質であり、
水性媒体中でアルカリまたは酸フォスファターゼ
またはスルファターゼにより分解されて式



の強い発光を発する、深い黄色乃至赤色の共鳴構
造アニオン(mesomeric anion)となる。

したがって、式(1)の新規なフォスファター
ゼまたはスルファターゼ試薬は生体物質中のフォ
スファターゼまたはスルファターゼの直接検出に
適している。これらは特に臨床分析におけるアル
カリまたは酸フォスファターゼまたはスルファ
ターゼの比色定量および発光定量に用いて有利であ
る。

- 24 -

ときのような高価なモノクロメーターまたは干渉
フィルターの使用も必要としないので、極めて簡
単なフィルター式発光計を用いることが可能であ
る。

4. 驚くべきことには深色の発光を発するフェ
ノールイオン(Ⅱa-Ⅱb)が弱酸性条件下(た
とえばpH 5.2)でさえ生成するのである。した
がつて、酸フォスファターゼ活性を可視スペクト
ル領域で比色的に、または発光光度的に、連続訓
定の形で、従来はより時間のかかる非動的方法に
よつてのみ得られたような高い検出感度で追跡す
ることがはじめて可能になった。

本発明記載のリン酸エステルは極めて多様な体
液(血清、腎臓液、尿)中のフォスファターゼ活
性の定量に用いることができるが、本発明記載の
試薬を、米国特許明細書第3,772,840号の示
唆から類推されるように、液体(たとえば細菌感

- 26 -

染した尿)中の細菌の濃度の測定に用いることも可能である。この目的のためには、まず、フォスファターゼを含む細菌酵素をそれ自身は公知の方法(たとえば浸透圧ショック(osmotic shock);スフェロプラス生成(spheroplast formation))で遊離する。細菌存在数に関する本発明記載の化合物を利用して定量したフォスファターゼ活性から引出される。

式(1)の新規な硫酸エステルも先行技術のスルファターゼ試薬と比較してかなりの利点を有している。

1. 遊離した共鳴構造アニオン(Ⅱa-Ⅱb)が高いモル吸光度を有するために、長波長スペクトル域を用いる酵素反応の比色的追跡がはじめて可能になった。

2. フェノールイオン(Ⅱa-Ⅱb)の発光が、使用する試薬(1)の弱い発光との間にわずらわ

- 27 -

液(血清、腎臓液、尿)中のスルファターゼ活性の定量にも用いることができる。

本発明記載の化合物は水溶性が良好なので、水溶液の形で適宜緩衝溶液を加えて所望のpH値(たとえば酸フォスファターゼに関してはpH4.5~7、アルカリフォスファターゼに関してはpH7~10)にし、フォスファターゼまたはスルファターゼ活性の定量用に用いることができるが、それ自身は公知の手法で担体に本件新規エステルを添加し、不均一系で検出反応を行なわせることも可能である。適当な担体物質の例は濾紙、または、二酸化ケイ素を有機結合剤を用いてプラスチック(たとえばポリスチレン)に載せたものである。この方法では、検査すべき液体を加えた後に変色または発光を発する試験ストリップを作製することが可能で、その色または発光は臨床分析に通常使われる比色計または発光計で測定

- 28 -

しい重り合いを全く生じない。(上記参照)

3. 一般的に無視できない妨害となる生体物質の発光バックグラウンドを生ずるような紫外光による励起もフルオレツセインO-硫酸塩を使用する場合に用いるような高価なモノクロメーターや干渉フィルターの使用も必要としないため、極めて簡単なフィルター型発光計を用いることが可能である。

4. 深色の発光性ヒドロキシル基アニオン(Ⅱa-Ⅱb)は、驚くべきことには、弱酸性条件下(たとえばpH5.2)でさえ生成する。したがってスルファターゼの活性をこのスペクトル領域で、発光光学的に、従来はより時間のかかる非動的方法によつてのみ得られたような高い検出感度で、連続測定により追跡することがはじめて可能になった。

本発明記載の硫酸エステルは極めて広範囲の体

- 28 -

できる。未知試料中のフォスファターゼ活性またはスルファターゼ活性の定量は、水溶液中または試験ストリップ上の光吸収または発光強度の時間的変化をフォスファターゼまたはスルファターゼ含有量既知の標準試料それと比較すれば可能である。

シグマケミカル社からの下記フォスファターゼ製品は、以下に式べるフォスファターゼ定量実験に標準試料として用いた。

- a) アルカリフォスファターゼ(EC. 8.1.1.8.1): I-S型(P7640)(ウシの睾丸粘液より)
- b) 酸フォスファターゼ(EC. 8.1.1.2): II型(P6760)
- M-S型(P1146)および
- V型(P1267)

(小麦胚芽、じゃがいも、牛乳および牛の卵

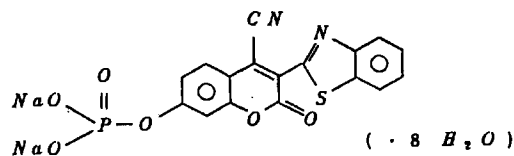
- 80 -

丸より)

シグマケミカル社からの下記スルファターゼ製品は、スルファターゼの定量実験に標準試料として用いた。

- a) アリールスルファターゼ (E. C. 3. 1. 6. 1) : V 型 (S 8 6 2 9)、
 ユルガータの膝蓋 (*Patella vulgata*) より、
- b) アリールスルファターゼ (E. C. 3. 1. 6. 1) : M 型 (S 1 6 2 9)
 アエロバクターアエロゲネス (*Aerobacter aerogenes*) より、
- c) アリールスルファターゼ (E. C. 3. 1. 6. 1) : H - 1 型 (S 9 6 2 6)
 ヘリクスボマチア (*Helix pomatia*) より
- EC はいずれの場合にも国際的に適用する酵素

- 8 1 -



の化合物とて構成されている。

精製するために残査をエタノール/水 (4 : 1) から再結晶させる。融点 82.5℃ (分解) のオレンジ色の結晶が得られる。

この化合物はたとえば水、メタノール、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルフォキシドおよびエチレングリコールモノメチルエーテルに溶解する。

酵素的水分解の比色的追跡のためには 510 nm における吸光度を測定した。

酵素的水分解の蛍光光度的追跡のためには 510 nm に最大強度を有する励起光を選び蛍光

- 8 8 -

カタログ (Enzyme Catalogue) を表わす。

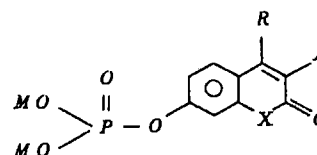
実施例 1

8.9 g (28 ml; 0.25 モル) のオキシ三塩化リンを 800 ml の乾燥ピリジンに 0 ~ 5℃ で冷却攪拌しながら滴々添加し、ついで 8.0 g (0.25 モル) の 8 - ベンゾチアゾリル - 4 - シアノ - 7 - ヒドロキシクマリンを同じ温度で少量ずつ約 80 分間かけて添加し、この混合物を 0 ~ 5℃ で 8 時間攪拌する。これを 2 リットルの氷水に注ぎ込み、6.6 g (45 ml; 0.75 モル) の 45 重量% 強度の水酸化ナトリウム溶液を攪拌しながら滴々添加して pH 値を約 7 にし、この混合物を 10 時間攪拌し、回転蒸発器を用いて 40℃ で真空中で乾燥するまで蒸発させ、さらに真空中 40℃ で恒量に達するまで乾燥する。残査 (18.5 g) は 4.4 g の塩化ナトリウムと 14.1 g (理論量の 96%) の式

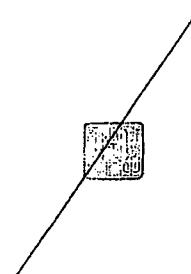
- 8 2 -

は 595 nm で測定した。この波長では酵素的に分解した基質の蛍光のみが排他的に記録される。

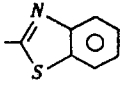
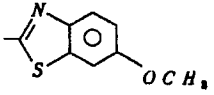
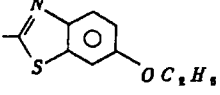
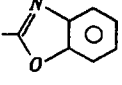
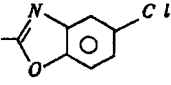
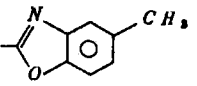
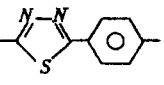
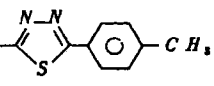
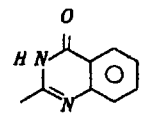
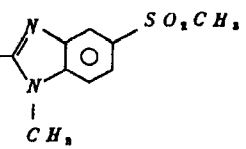

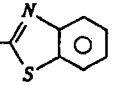
下記的一般式



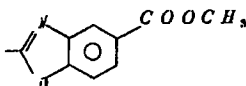
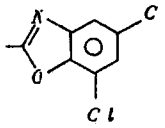
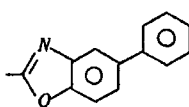
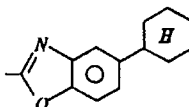
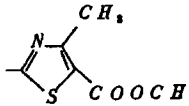
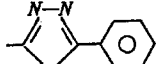

のリン酸エステルは対応する出発化合物を用いて同様に調製される。



- 8 4 -

| 実施例 | M | R | A | X | 融点 (分解) |
|--------|-----------------|----|---|-------------------------------------|---------|
| 2 | Na | H |  | O | 801° |
| 8 | K | CN |  | O | 809° |
| 4 | Na | H |  | O | 802° |
| 5 | Na | CN |  | O | 810° |
| 6 | NH ₄ | H |  | O | 218° |
| 7 | K | CN |  | O | 804° |
| - 85 - | | | | | |
| 8 | Na | CN |  | O | 808° |
| 9 | Li | H |  | O | 800° |
| 10 | Na | CN |  | O | 880° |
| 11 | K | CN |  | O | 817° |
| 12 | Na | CN |  | O | 815° |
| 18 | NH ₄ | H |  | N-C ₄ H ₉ - n | 800° |

- 86 -

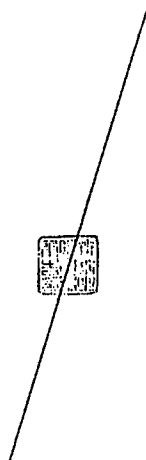
| | | | | | |
|----|--------------------|----|---|---------------|----------------|
| 14 | K | H |  | $N-CH_3$ | 818° |
| 15 | Na | H |  | $N-COOC_2H_5$ | 822° |
| 16 | $H_2N(C_2H_4OH)_2$ | CN |  | O | 262° |
| 17 | $HN(C_2H_5)_2$ | H |  | O | 278° |
| 18 | Na | CN |  | O | 807° |
| 19 | K | CN |  | O | 816° - 87 - |
| 20 | Na | CN | CN | O | 827° |
| 21 | K | CN | $COOCH_3$ | O | 304° |
| 22 | Na | CN | SO_2CH_3 | O | 812° |
| 23 | Na | CN | $SO_2-C_6H_5$ | O | 826° |
| 24 | K | CN |  | O | 805° |

実施例 25

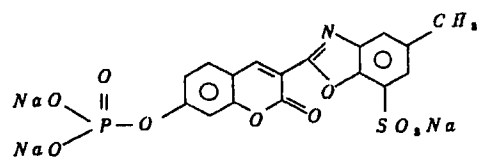
20～80℃において225mlの乾燥アセトニトリルに61.8gの五塩化リン(0.8モル)を、ついで22.6gの8-(5-メチル-7-スルフォベンズオキサゾール-2-イル)-7-ヒドロキシマリンピリジニウム塩(0.05モル)を冷却攪拌しながら添加し、この混合物を20～25℃で18時間攪拌する。この混合物を15gの水の中に注ぎ、16.6g(11.2ml; 1.9モル)の45重量%水酸化ナトリウム溶液を攪拌しながら滴々添加してpH値を約7とし、この混合物を10時間攪拌する。回転蒸発器(rotary evaporator)を用いて母液を乾燥するまで蒸発させ、残渣を2gの沸騰メタノールで抽出する。抽出液を室温で母液を通して乾燥するまで蒸発させ、式

- 89 -

のスルフォ基を含有するリン酸エステルを対応する出発化合物を用いて同様に調製した。



- 41 -

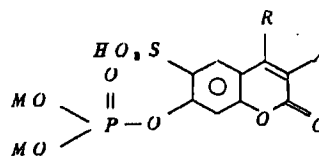


の化合物24.8gを得た。このものの水の中での λ_{max} は860nmであった。

酵素的加水分解の比重監視のためには480nmにおける吸光度を測定した。

フォスファターゼによる酵素的加水分解の追跡のためには蛍光計中で約450nmで励起し、約495nmで発光を測定した。実際には酵素的に分解した基質の蛍光強度のみをここに記録した。

下記の、一般式



- 40 -

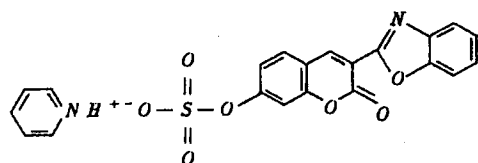
| 実施例 | M | R | A | λ_{max} (水中) |
|-----|----|----|---|-------------------------|
| 26 | Na | CN | | 417nm |
| 27 | K | H | | 872' |
| 28 | Na | CN | | 410' |
| 29 | Na | H | | 862' |
| 30 | Na | CN | | 415' |

- 42 -

実施例 81

1.46g (0.88mmol; 125ミリモル)のクロロスルホン酸を5mlの乾燥ピリジンに冷却撹拌しながら滴々添加し、ついで生成したピリジン-クロロスルホン酸塩を加温して溶解させる。

0.7g (25ミリモル)の8-ベンズオキサゾリル-7-ヒドロキシクマリンを添加したのち、この混合物を60℃に24時間加温する。20mlの水を添加し、不溶解物質を沸点で浮別する。冷却すると式

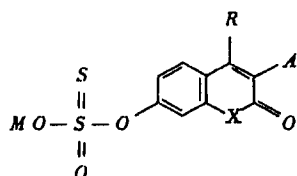


の化合物0.8g (理論量の73.5%)が再結晶する。この黄土色の結晶は201~202℃の融点を有している。

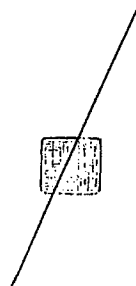
- 48 -

が得られる。

下記的一般式



の硫酸エステルを対応する出発化合物を用いて同様に調製した。



- 45 -

この化合物はたとえば水、メタノール、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルfoxidおよびエチレングリコールモノメチルエーテルに溶解する。

酵素的加水分解の比色的監視には、480nmにおける吸光度を測定した。

酵素的加水分解の蛍光的監視には480nmに最大を有する励起光を選び470nmにおける蛍光を測定した。この波長では酵素的に分解した基質の蛍光が排他的に記録される。

実施例 82

実施例81記載の硫酸エステルのナトリウムを調製するためには、上記混合物に20mlの水を添加したのち、8gの固体炭酸水素ナトリウムを添加し、晶出したナトリウム塩を吸引浮別する。精製は水からの再結晶により行なう。融点254℃ (分解)の黄色結晶 (0.7g; 理論量の74%)

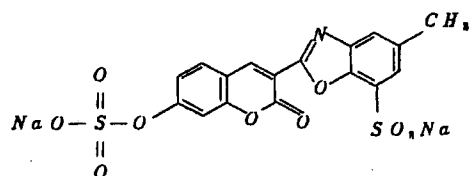
- 44 -

| 点 | 融 | 208-205℃ | 189℃ | 286℃ (分解) |
|-----|---|----------------------------------|----------------------------------|-----------|
| X | | 0 | 0 | 0 |
| A | | | | |
| R | | H | H | CN |
| M | | C ₅ H ₅ NH | C ₅ H ₅ NH | Na |
| 実施例 | | 83 | 84 | 85 |

- 46 -

実施例 88

1.46g (0.88mmol; 125ミリモル)のクロロスルホン酸を10mlの乾燥ピリジンに冷却、攪拌しながら滴々添加し、ついで生成したピリジノン-クロロスルホン酸錯塩を加温して溶解させる。1.1g (2.5ミリモル)の8-(5-メチル-7-スルフォベンズオキサゾール-2-イル)-7-ヒドロキシクマリンピリジニウム塩を添加したのち、この混合物を70℃に約5時間加温する。この溶液に40mlの水を添加し、10N NaOHを用いて溶液のpH値を約7にする。この溶液を回転蒸発器を用いて乾燥するまで蒸発させる。精製のため、残渣をエタノール/水(4:1)から再結晶させる。融点287℃(分解)の式



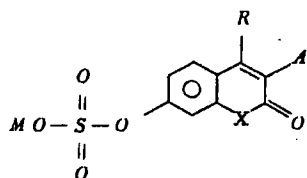
の化合物の黄色結晶(1.1g; 理論収量の89%)が得られる。

酵素的加水分解の比色監視には480nmにおける吸光度を測定する。

スルファターゼによる酵素的加水分解の発光的追跡には、励起は蛍光計中で480nmで行ない、470nmで発光量を測定した。実際には酵素的に分解した基質の発光のみをここに記録した。

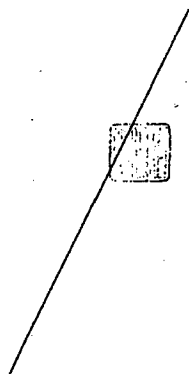
下記的一般式

- 47 -

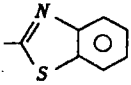
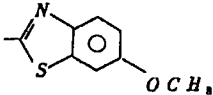
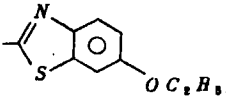
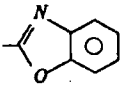
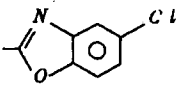
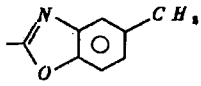
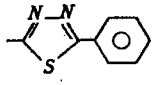
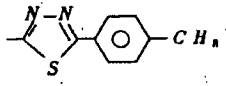
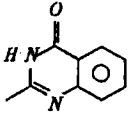
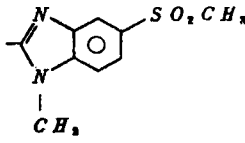



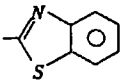
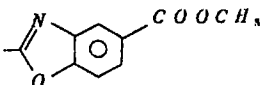
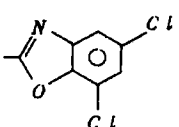
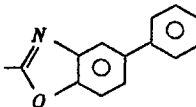
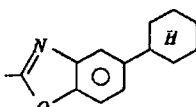
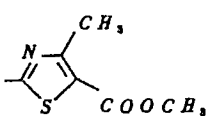
の硫酸エステルを対応する出発化合物を用いて同様に調製した。

- 48 -

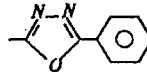



- 49 -

| 実施例 | M | R | A | X | λ_{max} (水中) |
|--------|-----------------|----|--|---|-------------------------|
| 37 | Na | H |  | O | 368 nm |
| 38 | K | CN |  | O | 422 " |
| 39 | Na | H |  | O | 374 " |
| 40 | Na | CN |  | O | 411 " |
| 41 | NH ₄ | H |  | O | 368 " |
| - 50 - | | | | | |
| 42 | K | CN |  | O | 414 nm |
| 43 | Na | CN |  | O | 418 " |
| 44 | Li | H |  | O | 371 " |
| 45 | Na | CN |  | O | 408 " |
| 46 | K | CN |  | O | 412 " |
| 47 | Na | CN |  | O | 405 " |

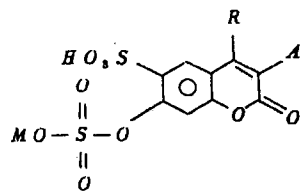
| | | | | | |
|----|--------------------|----|--|---------------|--------|
| 48 | NH_4 | H |  | $N-C_4H_9-n$ | 888 nm |
| 49 | K | H |  | $N-CH_3$ | 876 " |
| 50 | Na | H |  | $N-COOC_2H_5$ | 868 " |
| 51 | $H_2N(C_2H_4OH)_2$ | CN |  | O | 410 " |
| 52 | $HN(C_2H_5)_2$ | H |  | O | 861 " |
| 58 | Na | CN |  | O | 415 " |

- 52 -

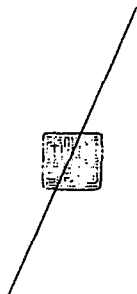
| | | | | | |
|----|----|----|---|---|--------|
| 54 | K | CN |  | O | 407 nm |
| 55 | Na | CN | CN | O | 898 " |
| 56 | K | CN | $COOCH_3$ | O | 894 " |
| 57 | Na | CN | SO_2CH_3 | O | 894 " |
| 58 | Na | CN | $SO_2-C_6H_5$ | O | 896 " |
| 59 | K | CN |  | O | 889 " |

- 58 -

以下の一般式



のスルフォ基を含有する硫酸エステルは同様にし
て対応する出発化合物を用いて調製された。



- 54 -

実施例 65

螢光計のセルを、28℃で、実施例(11)で得た化合物の0.1ミルモル水溶液8mlで満たし、クエン酸緩衝液(クエン酸0.05モル/リットル)でpH5.2とし、励起波長を510nmに、発光波長を595nmに調節し、酸フォスファターゼ活性を測定すべき体液(血清または腎臓液)で、1ml中のフォスファターゼ含有量が0.1mgの程度であるはずのものを0.1ml添加し、発光強度の時間的変化を、ほぼ1~8分間にわかつて、断もつて作製した補正曲線との比較で追跡する。螢光強度の初期の直線的な起ち上がりが酵素活性の直接の尺度である。上述の構成において酸フォスファターゼの検出限界は1mlあたり約 1×10^{-5} 酵素単位である。公知のフォスファターゼ試薬類を用いた場合、このスペクトル領域でこのような感度を有する酸フォスファターゼ活性の動的測定は従

- 56 -

| 実施例 | M | R | A | λ_{max} (水中) |
|-----|----|----|---|-------------------------|
| 60 | Na | CN | | 420nm |
| 61 | K | H | | 872' |
| 62 | Na | CN | | 418' |
| 68 | Na | H | | 864' |
| 64 | Na | CN | | 418' |

- 55 -

来は不可能であつた。非動的方法是実際に同様の感度を有しているが、より長時間を要し、費用がかかる。

螢光測定のかわりに全く類似の手段で510nmでの吸光度の変化によつても、より低感度ではあるが反応を追跡することができる。

じやがいもの酸フォスファターゼ(酵素カタログ(Enzyme catalog No. 8, 1, 8, 2, N-S型)はシグマケミカル社(Sigma Chemical Co.)からp-1146番として購入できるが1.9酵素単位/mgの活性を持ち、補正用物質として使用し得る。(酵素単位はpH4.8および37℃で1分間あたり1マイクロモルのリン酸p-ニトロフェニルを加水分解する酵素量として定義される。)

実施例 66

螢光計のセルを28℃でpH6.2の酢酸緩衝液

- 57 -

(酢酸塩 0.05 モル/リットル)を加えた実施例 81 の化合物の 0.1 ミリモル水溶液 8 ml でみだし、励起波長を 510 nm に、発光波長を 595 nm に調節し、スルファターゼ活性を測定すべき体液 (血清または腎臓液) でスルファターゼ含有量が 1 ml あたり 1 ㏄の程度であるはずのものを 0.1 ml 添加し、発光強度の時間的変化を約 1~80 分にわたり、あらかじめ作製した補正曲線との比較で追跡する。発光強度の初期の直線的な起ち上がりが酵素活性の直接的な尺度である。上記の構成ではスルファターゼの検出限界は 1 ml あたり約 1×10^{-3} 酵素単位である。公知のスルファターゼ試薬を用いてはこのスペクトル領域でこのような感度でスルファターゼ活性の動的測定は従来は不可能であつた。非動的方法は実際に同様な感度を有するが、より長時間を要し、かつ費用がかかる。

シグマケミカル社から 58629 番として購入

- 58 -

できるパテラブルガータ (*Patella vulgata*) からのスルファターゼ (酵素カタログ No 8. 1. 6. 1.、V 型) は 9 酵素単位/㏄の活性を有し、補正用物質として使用し得る。(酵素単位は pH 5.0、87°C で 1 時間あたり 1 マイクロモルの硝酸ニトロカテコールを加水分解する酵素量として定義される。)

発光測定のかわりに、全く類似の手法で、510 nm における吸光度の変化により、より低い感度ではあるが反応を追跡することができる。

本明細書および実施例は説明のために提出されたものであつて限定的なものではなく、本発明の精神および範囲から逸脱することなく各種の修正や変更がなされ得るものとして評価されるべきである。

特許出願人 バイエル・アクチエンゲゼルシャフト

代理人 弁護士 小田島 平 吉



- 59 -

第 1 頁の続き

| ①Int. Cl. ³ | 識別記号 | 庁内整理番号 |
|------------------------|------|---------|
| G 01 N 33/52 | | 8305-2G |
| // (C 07 D 405/04 | | |
| 213/00 | | 7138-4C |
| 311/00) | | 7169-4C |
| (C 07 D 405/04 | | |
| 235/00 | | 6917-4C |
| 311/00) | | 7169-4C |
| (C 07 D 405/04 | | |
| 239/00 | | 6970-4C |
| 311/00) | | 7169-4C |
| (C 07 D 413/04 | | |
| 263/00 | | 7330-4C |
| 311/00) | | 7169-4C |
| (C 07 D 413/04 | | |
| 271/00 | | 7330-4C |
| 311/00) | | 7169-4C |
| (C 07 D 413/04 | | |
| 215/00 | | 6675-4C |
| 263/00) | | 7330-4C |
| (C 07 D 417/04 | | |
| 277/00 | | 7330-4C |
| 311/00) | | 7169-4C |
| (C 07 D 417/04 | | |
| 285/00 | | 7330-4C |
| 311/00) | | 7169-4C |

| ①Int. Cl. ³ | 識別記号 | 庁内整理番号 |
|------------------------|------|---------|
| (C 07 D 417/04 | | |
| 215/00 | | 6675-4C |
| 277/00) | | 7330-4C |

優先権主張 ②1983年6月10日③西ドイツ (DE)④P3321041.1

⑦発明者 オット・エス・ボルフバイス
オーストリア国アー8045グラーツ・シエツケルパツハベーク37
ペー